

Hochdurchsatz DNA-Isolierung und –Transfektion zur Analyse der Funktion von Genen bzw. Genprodukten

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Screenen einer Sammlung von Nukleinsäuremolekülen auf eine gewünschte Eigenschaft der Nukleinsäure oder eines davon kodierten (Poly)peptids, umfassend die Schritte (a) automatisiertes Picken einer Sammlung von Zellen, die die Sammlung von Nukleinsäuremolekülen enthalten, mittels eines ersten Roboters; (b) automatisierte Lyse der Zellen mittels eines zweiten Roboters; (c) automatisierte Abtrennung der Zell-DNA vom Zelldebris mittels des zweiten Roboters; (d) optional automatisierte Abtrennung von Endotoxinen von der DNA mittels des zweiten Roboters sofern die Zellen Bakterien sind; (e) automatisierte Transfektion von Zellen mit der in Schritt (c) oder, sofern die Zellen Bakterien sind, in Schritt (d) erhaltenen DNA mittels eines dritten Roboters; und (f) automatisiertes Screenen auf die gewünschte Eigenschaft mittels eines vierten Roboters. Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Verbesserung der Bindungseigenschaften des (Poly)peptids, das durch das erfindungsgemäße Screeningverfahren identifiziert oder von der identifizierten oder isolierten DNA kodiert wird, sowie ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels auf der Basis von mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen (Poly)peptiden und ferner die Formulierung des erhaltenen Stoffes mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel.

In der Beschreibung ist eine Anzahl von Dokumenten aus dem Stand der Technik zitiert. Der Offenbarungsgehalt dieser Dokumente ist hiermit per Referenz in seiner Gesamtheit in die vorliegende Beschreibung inkorporiert.

Hochdurchsatzscreening ist ein seit Jahren bewährtes Instrument zur Auffindung potentieller Wirkstoffe in der pharmazeutischen Forschung. Die Übertragung von Hochdurchsatztechnologie auf Verfahren wie DNA-Isolierung aus Bakterien sowie der Transfektion zellulärer Systeme ist ein relativ neuer Ansatz. Dabei ist

insbesondere das Screenen von cDNA-Bibliotheken von Interesse. Das Screening von cDNA- oder generischen Bibliotheken, die üblicherweise in Bakterien kloniert vorliegen, erfordert einen Prozeß, der sich allgemein in vier Stufen unterteilen läßt und 1) das Picken der Bakterienkolonien, 2) die DNA-Präparation, 3) die DNA-Transfektion sowie 4) das Auslesen eines funktionellen Tests umfaßt.

Die Isolierung von DNA aus Bakterien erfolgt üblicherweise anhand von zwei verschiedenen Methoden: Alkalische Lyse von Bakterien mit anschließender Aufreinigung der gewonnenen DNA über Säulen oder Adhesion der aus alkalischer Lyse gewonnenen DNA an spezielle Mikropartikel (sogenannte „Beads“).

Ein Protokoll zur alkalischen Lyse findet sich beispielsweise in (Sambrook et al. „Molecular Cloning, A Laboratory Handbook“ CSH Press, Cold Spring Harbor 1989; oder Ausubel et al.; Current Protocols, in Molecular Biology 2002; John Wiley & Sons, Inc., N.Y.) beschrieben. Methoden zur Aufreinigung von DNA, RNA oder deren Hybriden mit Hilfe magnetischen Silica-Partikeln sind beispielsweise in US 6,027,945 bzw. WO 98/31840 beschrieben. Die Entfernung von Zell-Debris durch den Einsatz von magnetischen Mikropartikeln wird in US 5,646,283 gezeigt.

Diese Aufreinigung beruht in der Regel aber auf chemischen Reinigungsmethoden und ist daher nur sehr bedingt für das Screenen komplexer Bibliotheken geeignet.

Entsprechende Verfahren sind für die Durchführung im Labor oder auf Pipetierautomaten für einen geringen Probendurchsatz ausgelegt. Der Tagesdurchsatz variiert und ist je nach Methode auf maximal 3000-6000 Präparationen pro Tag beschränkt. Durch den begrenzten Probendurchsatz sind diese Methoden nicht für den Hochdurchsatz geeignet.

Zur Transfektion von DNA in eukaryontische Zellsysteme erfüllen chemische Methoden wie Lipofektion die Anforderungen für einen Hochdurchsatz an Proben. Durch die Herstellung Zellmembran-permeabler DNA-Komplexe oder durch das Eindringen bzw. der Verschmelzung mit der Zellmembran kann DNA in die Zelle eingeschleust werden. Ebenfalls für den Hochdurchsatz geeignet sind physikalische Methoden, wie Magnetofektion oder Elektroporation.

Einzelne Stufen von Screening-Prozessen komplexer Bibliotheken lassen sich bereits in automatisierter Form durchführen. Entsprechende Geräte sind von Beckman Coulter oder Tecan erhältlich. Der Biomek 2000 (Beckman Coulter; Fullerton, USA) bzw. der Genesis (Tecan; Durham, USA) sind semi-automatisierte Arbeitsplattformen für die Verwendung von Mikrotiterplatten. Diese Systeme stellen allgemeine Arbeitsplattformen dar, die sich beispielsweise für den Einsatz zur DNA-Präparation adaptieren lassen. Die Anwendungsmöglichkeiten sind jedoch eingeschränkt, da z.B. keine Zentrifugen integriert sind. Somit sind vorteilhafte Versuchs-Protokolle, wie beispielsweise eine DNA-Präparation durch alkalische Lyse („Mini-Prep“) nicht durchführbar. Zudem sind manuelle Schritte wie z.B. zum Pelletieren/Präzipitieren der Bakterien nötig.

In der EP 569 115 A2 wird ein automatisiertes Hochdurchsatz-DNA-Präparationssystem für die Verwendung von Mikrotiterplatten beschrieben. Durch die Integration von modifizierten Zentrifugen wird eine DNA-Präparation nach der alkalischen Lyse ermöglicht. Insofern stellt dieses Verfahren gegenüber den vorstehend beschriebenen Prozessen aus dem Stand der Technik bereits eine Verbesserung dar. Allerdings wird ein Reinheitsgrad der DNA, wie er für den Einsatz von Transfektionen erforderlich ist, nicht erreicht. Dies liegt unter anderem daran, daß die DNA noch durch Endotoxine kontaminiert ist. Nachteilig ist auch, daß dieses System wie auch das Genesis (Tecan)- und das Biomek 2000 (Beckman) -System nicht als Bandstraßensystem konzipiert ist bzw. als solches ausgebaut werden kann. Eine Verschachtelung der einzelnen Arbeitsschritte ist daher nicht möglich. Der Probendurchsatz der vorgenannten Systeme ist somit im Höchstfall auf etwa 3000-6000 Präparationen / Tag beschränkt.

In der PCT/EP00/00683 wird ein Verfahren zur Identifizierung von Nukleinsäuresequenzen, die eine nicht selektionierbare Aktivität aufweisen, beschrieben. Das Verfahren umfaßt die Schritte von der Bereitstellung der DNA-Bibliothek über das Kultivieren der Wirtszellen, die DNA-Präparation, Transfektion der Zielzellen mit der Ziel-DNA bis zur funktionellen Bestimmung der Aktivität der DNA in der Zielzelle. Diese Anmeldung stellt bereits ein Verfahren dar, das einen

gewissen Automatisierungsgrad der DNA-Präparationen beinhaltet. Entsprechend werden Ausführungsformen für zwei Roboter, die jeweils die DNA-Präparation und DNA-Transfektion durchführen können, dargestellt. Auch mit diesem Verfahren lassen sich Probendurchsätze in der Größenordnung von über 10^3 Präparationen pro Tag bewerkstelligen.

Die PCT/EP00/13132 beschreibt ein Screeningverfahren für Nukleinsäuren, das auch Nukleinsäuren mit selektionierbarer Aktivität beinhaltet. Neben dem Screeningverfahren ist auch die Automatisierung des Verfahrens sowie eine bevorzugte Ausführungsform zur Durchführung der DNA-Präparation und DNA-Transfektion unter Zuhilfenahme einzelner Roboter erfaßt. Mit diesem Verfahren lassen sich ebenfalls Probendurchsätze in der vorgenannten Größenordnung fahren.

Alle vorstehend beschriebenen Verfahren haben den Nachteil, daß sie für das Screenen vollständiger Genbanken auf Moleküle mit gewünschten Eigenschaften in einem kürzeren Zeitrahmen ungeeignet sind. Das Screenen von Genbanken mit beispielsweise einer Komplexität von bis zu oder sogar über 10^6 cDNA's erfordert nämlich einen hohen Probendurchsatz pro Tag, um praktisch handhabbar zu sein und in einem überschaubaren zeitlichen Rahmen zu den gewünschten Eigenschaften zu führen. Ein derartiger Probendurchsatz ist nicht nur durch eine Optimierung der im Stand der Technik beschriebenen einzelnen Prozesse möglich. Vielmehr müssen neue Wege beschritten, d.h. neue Kombinationen von Prozessen ermittelt werden, damit Genbanken mit einem hohen Komplexitätsgrad funktioneller Studien in einem annehmbaren und für therapeutische Entwicklungen sinnvollen Zeitrahmen unterworfen werden können. Das der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende technische Problem war, ein diesen Anforderungen gerecht werdendes Verfahren bereitzustellen.

Dieses technische Problem wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

Demgemäß betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Screenen einer Sammlung von Nukleinsäuremolekülen auf eine gewünschte Eigenschaft der Nukleinsäure oder

eines davon kodierten (Poly)peptids, umfassend die Schritte (a) automatisiertes Picken einer Sammlung von Zellen, die die Sammlung von Nukleinsäuremolekülen enthalten, mittels eines ersten Roboters; (b) automatisierte Lyse der Zellen mittels eines zweiten Roboters; (c) automatisierte Abtrennung der Zell-DNA vom Zelldebris mittels des zweiten Roboters; (d) gegebenenfalls automatisierte Abtrennung von Endotoxinen von der DNA mittels des zweiten Roboters, sofern die Zellen Bakterien sind; (e) automatisierte Transfektion von Zellen mit der in Schritt (c) oder, sofern die Zellen Bakterien sind, in Schritt (d) erhaltenen DNA mittels eines dritten Roboters; und (f) automatisiertes Screenen auf die gewünschte Eigenschaft mittels eines vierten Roboters.

Der Schritt (d) des erfindungsgemäßen Verfahrens ist optional. Speziell bei geringer Sensitivität der zu transfizierenden vorzugsweise eukaryontischen Zellen gegenüber Endotoxin wird er zwar bevorzugt durchgeführt, kann aber auch entfallen.

Entsprechend umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren entweder die Schritte (a), (b), (c), (d), (e) und (f) oder die Schrittfolge (a), (b), (c), (e) und (f).

Letztere Schrittfolge kann erfindungsgemäß auch als (a) (b) (c) (d') und (e') bezeichnet werden, wobei der Schritt (d') dem Schritt (e) und der Schritt (e') dem Schritt (f) entspricht.

Der Begriff "Sammlung" im Sinne dieser Erfindung betrifft eine Anzahl von Nukleinsäuremolekülen jenseits von 10^3 verschiedenen Molekülen, vorzugsweise von mindestens 10^4 verschiedenen Molekülen, stärker bevorzugt von mindestens 10^5 verschiedenen Molekülen und besonders bevorzugt von 10^6 verschiedenen Molekülen wie 2×10^6 oder 3×10^6 verschiedenen Molekülen.

Die "Nukleinsäuremoleküle" sind vorzugsweise codierende Regionen zusammen mit homologen oder heterologen Expressionskontrollsequenzen. Besonders bevorzugt ist, daß sie das Genom eines Organismus repräsentieren oder im wesentlichen repräsentieren. Dieser Organismus kann ein Prokaryot, beispielsweise ein Bakterium, oder ein Eukaryot, z.B. eine Hefe, sein. Sofern der Organismus ein

Eukaryot ist, ist er in einer bevorzugten Ausführungsform ein Säuger, beispielsweise ein Mensch.

Der Begriff "(Poly)peptid" beschreibt sowohl Peptide wie auch Polypeptide (Proteine). Dabei wird konventionsgemäß eine Kette von bis zu 30 Aminosäuren als Peptid und eine Kette von über 30 Aminosäuren als Polypeptid bezeichnet.

Der Begriff "automatisiert" bedeutet im Sinne dieser Erfindung, daß der jeweilige Schritt nicht von Menschenhand, sondern rein maschinell durchgeführt wird. Allerdings schließt diese Begriffsbestimmung selbstverständlich Manipulationen und Einstellungen an der Maschine (dem Roboter) durch Menschenhand ein.

Der Begriff "Zelldebris" bedeutet im Sinne dieser Erfindung die nach Lyse einer Zelle erhaltene Masse aus Zellbestandteilen, die durch Zentrifugation beispielsweise bei 3000 x g von wässrigem Überstand, welcher die DNA enthält, abgetrennt werden kann. Zelldebris enthält üblicherweise Proteine und, bei Bakterien, Zellmembranbestandteile.

Der Begriff "Roboter" bedeutet automatisierte Arbeitsstation mit Greifarmen und spezifischen Produktbearbeitungsstationen wie z.B. Zentrifugen, Inkubationsplätzen etc.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wird ein Screeningverfahren bereitgestellt, bei dem die vier Verfahrensschritte Kolonie-Picken, DNA-Präparation, DNA-Transfektion sowie das Auslesen eines funktionalen Screening Assays durch Roboter automatisiert durchgeführt werden und damit ein für ein Hochdurchsatzscreening automatisierter Gesamt-Prozeß ermöglicht wird. Als wesentlicher Bestandteil dieses Verfahrens in einer Ausführungsform (d.h. der Schritt (d) einschließenden Ausführungsform) ist die automatisierte Entfernung von Endotoxinen, vorzugsweise mit Hilfe magnetischer Mikropartikel zu betrachten. Erst hierdurch wird, in Kombination mit den weiteren automatisierten Schritten, ein zeitlich annehmbarer Rahmen für das Hochdurchsatzscreening von Bibliotheken mit einem hohen Komplexitätsgrad erreicht. Um die DNA für die Transfektion direkt einsetzen zu können, ist die Reinigung der DNA von Endotoxinen in dieser Ausführungsform nämlich eine essentielle Voraussetzung. Somit erst kann die aus der DNA-Präparation gewonnene DNA direkt für Analysen und Transfektionen eingesetzt werden. Besonders vorteilhaft ist, daß zeitintensive Zentrifugationsschritte erheblich

reduziert werden. Methoden zur Entfernung von Endotoxinen aus DNA, RNA oder deren Hybriden mit Hilfe von magnetischen Silica-Partikeln sind in US 6,194,562 bzw. WO 99/54340 beschrieben.

In einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens (nämlich der Ausführungsform ohne Schritt (d)) ist die Abtrennung der Endotoxine nicht essentiell. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn die zu transfizierenden Zellen gegenüber Endotoxinen eine geringe Sensitivität aufweisen und daher bei üblichen DNA-Aufreinigungsverfahren durch Endotoxin-Kontamination nicht wesentlich beeinträchtigt oder abgetötet werden.

Durch die Kombination der automatisierten Einzelprozesse, die von zusammengeschalteten Robotern durchgeführt werden, kann erstmals ein Probendurchsatz von bis zu 30000 / 40000 Proben pro Tag erreicht werden. Mit anderen Worten, durch die Kombination serieller Produktionstechnik mit den beschriebenen Komponenten (gemäß beider oben beschriebenen Ausführungsformen) kann ein bisher nicht erreichter Durchsatz bei der Herstellung transfektionsfähiger DNA generiert werden. Diese können mit demselben Hochdurchsatz-Verfahren nach der Transfektion in vorzugsweise eukaryontischen Zellen auf ihre biologische Funktion hin untersucht werden. Dies ermöglicht das Screenen einer kompletten cDNA-Genbank innerhalb eines Monats.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Sammlung von Nukleinsäuremolekülen eine Genbank.

Der Begriff "Genbank" ist im Stand der Technik bekannt und in Winnacker, "Gene und Klone", VCH Weinheim 1985 (S. 403) definiert als "Sammlung klonierter DNA-Fragmente, die ein gesamtes Genom repräsentieren". Die Erfindung schließt auch solche Genbanken ein, die Lücken aufweisen, d.h. nicht das gesamte Genom repräsentieren oder die ein Expressionsstadium, z.B. eines bestimmten Gewebes, eines Krankheits- oder Entwicklungsstadiums etc. repräsentieren.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die Nukleinsäuremoleküle genomische DNA- oder cDNA-Moleküle oder RNAi-

Oligonukleotide. Entsprechende RNAi-Oligonukleotide werden beispielsweise von Dharmcon (LaFayette, USA) Xeragon (Germantown, USA) oder Ambion (Austin, USA) synthetisiert.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Genbank eine Expressions-cDNA-Genbank, vorzugsweise eine eukaryontische Genbank, besonders bevorzugt eine humane Genbank.

Auch der Begriff "Expressions-cDNA-Genbank" ist im Stand der Technik wohl verstanden. In einer Expressions-cDNA-Genbank sind die cDNA-Moleküle in einem Expressionsvektor kloniert, der ihre Expression in einem geeigneten Wirt ermöglicht; vgl. Winnacker, a.a.O. oder Sambrook et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual"; CSH Press, Cold Spring Harbor 1989.

Bevorzugt liegt die Genbank normalisiert (d. h. die in der Genbank enthaltenen Gene liegen in nahezu gleicher Anzahl vor) und/oder angereichert für „volle Länge cDNA“ vor.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist die Sammlung von Nukleinsäuren eine Klonsammlung. Unter einer Klonsammlung ist eine Kollektion ausgewählter cDNA-Klone zu verstehen, die bevorzugt „volle-Länge-cDNA“ enthält.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die Zellen in Schritt (a) und/oder Schritt (e) Säugerzellen, Insektenzellen, Hefezellen oder Bakterien.

Beispiele für Säugerzellen sind COS-Zellen, HUVEC-Zellen, Aspergillus (niger/nidulans etc.)-Zellen oder CHO-Zellen. Beispiele für Insektenzellen sind Spodoptera frugiperda-Zellen. Geeignete Hefezellen schließen solche der Arten S. cerevisiae oder P. pastoris ein. Geeignete Bakterien können sowohl gram-negativ wie auch gram-positiv sein.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die Bakterien gram-negative Bakterien.

Die besonders vorteilhaften Eigenschaften des erfindungsgemäßen Verfahrens kommen insbesondere bei gram-negativen Bakterien zum Tragen, da insbesondere diese Endotoxine als Zellwand- bzw. Zellmembranbestandteile aufweisen. Von den gram-negativen Bakterien werden insbesondere Bakterien der Art *E. coli* für Klonierungszwecke im Stand der Technik eingesetzt.

In einer am meisten bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens gehören die gram-negativen Bakterien daher zur Art *E. coli*. Besonders bevorzugt sind *E. coli* DH5 α , *E. coli* Shure und *E. coli* JM 109.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird mindestens einer der Schritte (a) bis (f) (mit oder ohne Schritt (d)) in Mikrotiterplatten durchgeführt.

Konventionelle Mikrotiterplatten weisen den Vorteil auf, daß sie unabhängig von der Anzahl der Vertiefungen ("Löcher") eine standardisierte Größe aufweisen, die sie besonders geeignet für eine automatisierte Handhabung durch Roboter macht. Mikrotiterplatten (beispielsweise erhältlich von der Fa. Nunc) bestehen üblicherweise aus PVC oder Polystyrol. Sie können 6, 24, 96, 384 oder 1536 Vertiefungen aufweisen. Bevorzugt eingesetzt im erfindungsgemäßen Verfahren werden Mikrotiterplatten mit 96 oder 384 Vertiefungen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden sämtliche Schritte (a) bis (f) (mit oder ohne Schritt (d)) in Mikrotiterplatten durchgeführt.

In einer zusätzlich bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die Mikrotiterplatten mit Barcodes versehen.

Diese Ausführungsform ist deshalb besonders vorteilhaft, da sie ein lückenloses "Tracking" sämtlicher Platten, auch nach dem Wechsel von einem Roboter zum nächsten ermöglicht. Eine Zuordnung kann somit auf besonders einfache und

zeitwährende Weise vom Ausplattieren der Zellen für die Bearbeitung durch den ersten Roboter bis zum funktionellen Screenen und Read-out durch den vierten Roboter erfolgen. Nach erfolgtem funktionellem Screenen kann so ohne weiteres auf die Ausgangsklone auf der Musterplatte zurückgegriffen werden.

Durch die Barcode-Technik auf den Robotern 2 und 3 wird zudem die Verschachtelung der einzelnen Prozesse innerhalb des Bandstraßensystems ermöglicht.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der erste Roboter gekennzeichnet durch mindestens eines und vorzugsweise alle der nachfolgenden Merkmale (a) digitales Bildverarbeitungssystem zur Erfassung der ausplattierten Bakterien, (b) Arbeits-Station mit Greifarm für Mikrotiterplatten zum Transfer der Mikrotiterplatten zwischen den Bearbeitungsstationen, (c) Separations-Modul, versehen mit einem oder mehreren Nadel-bestückten Köpfen zum Picken von ausplattierten Einzelkolonien und Ablage in Mikrotiterplatten, (d) integrierte Produktbearbeitungsstationen zur Säuberung der Nadeln zwischen den Arbeitsschritten und Replikation der abgelegten Einzelkolonien in Mikrotiterplatten und (e) Computer-gestütztes Strich-Code („Barcode“)-Identifikations-und Nachverfolgungssystem („Tracking“).

Die Mikrotiterplatten sind vorzugsweise 96- oder 384-Lochplatten. Die integrierten Produktbearbeitungsstationen schließen ein Sterilisationssystem ein. Bevorzugt ist ferner, daß der Greifarm ein Roboterarm ist, der mit mindestens zwei Spitzen-bestückten Köpfen versehen ist, wobei die Köpfe wechselseitig zum Picken eingesetzt und auf der Sterilisierungsstation gesäubert werden. Auch ist ein modularer Aufbau des Roboterarms bevorzugt, der einen Austausch von Greifarm-Modulen gegen Separationskopf-Module ermöglicht.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Lyse eine alkalische Lyse.

Die Durchführung der alkalischen Lyse ist u.a in Sambrook a.a.O. wie auch an anderer Stelle in dieser Beschreibung dargelegt.

In einer zusätzlichen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der zweite Roboter gekennzeichnet durch mindestens eines und vorzugsweise alle der nachfolgenden Merkmale (a) Bandstraßentransportsystem kombiniert mit Greifarmen für Mikrotiterplatten zum Umladen der Produkte und Transfer der Mikrotiterplatten zwischen den Produktbearbeitungsstationen, (b) im Transportsystem integrierte Produktbearbeitungsstationen, insbesondere Zentrifugen, Pipettier-Automaten, Schüttler und Inkubationsplätze zur Inkubation bei verschiedenen Temperaturen, (c) Sensorik zur Detektion von Produktpositionen sowie zur Fehlerdetektion, (d) Software zur verschachtelten Bearbeitung mehrerer in der Maschine befindlichen Prozesse für einen kontinuierlicher Produktionsbetrieb und (e) Computer-gestütztes Strich-Code („Barcode“-)Identifikations-und Nachverfolgungssystem („Tracking“) bevorzugt mit internem Produkt-Tracking, das eine Zeitstempel- („Timestamp“-) Funktion zur Verschachtelung zeitkritischer Subprozesse enthält.

Auch hier ist bevorzugt, daß die Mikrotiterplatten 96-, 384- oder 1536-Lochplatten sind.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Abtrennung der Zell-DNA in Schritt (c) mittels Silica-Partikel.

Der Begriff "Abtrennung der Zell-DNA mittels Silica-Partikel" im Sinne dieser Erfindung bedeutet, daß die Zell-DNA (d.h.Plasmid-DNA oder in einer alternativen Ausführungsform chromosomale DNA) an diese Partikel gebunden wird und vom Zelldebris abgetrennt wird. Im Prinzip ist der Abtrennungsschritt somit ein Aufreinigungsschritt. Die Silica-Partikel können auf einfache Weise durch Zentrifugation vom Zelldebris abgetrennt werden..

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die Silica-Partikel magnetische Silica-Partikel.

Die Ausführungsform ist deshalb besonders bevorzugt, weil die magnetischen Partikel auf einfache Weise durch Einsatz eines Magneten vom Zelldebris und sonstigem Überstand abgetrennt werden können. Entsprechende Verfahren sind z.B. in der US-A 6,027,945 und der WO 98/31840 beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Abtrennung der Endotoxine in Schritt (d) durch Fällung mit SDS/Isopropanol.

Eine geeignete Zusammensetzung beträgt 2,5% SDS in Isopropanol.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die an Silica-Partikel gebundene DNA durch Waschen mit Aceton weiter aufgereinigt.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Abtrennung der Endotoxine in Schritt (d) mittels Endotoxin-bindender Partikel, die vorzugsweise magnetische Endotoxin-bindende Partikel sind.

Die Endotoxin-bindenden Partikel können vorzugsweise als magnetische Partikel ausgestaltet sein.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Transfektion von Zellen in Schritt (e) durch Calciumphosphat, Elektroporation oder durch Lipofektion vermittelt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Transfektion von Zellen in Schritt (e) durch Calciumphosphat oder Lipofektion vermittelt. Eine Vermittlung der Lipofektion kann durch Lipide, Liposome oder Lipidkombinationen erfolgen. Beispiele hierfür sind Effectene (Qiagen; Hilden), Fugene (Roche, Basel), Metafectene (Biontex), Lipofektamine oder Lipfectamine 2000, Lipofectin, Oligofectamine (Invitrogen, Karlsruhe).

Für die Transfektion von RNAi-Oligonukleotiden sind besonders Metafecten, Oligofectamine oder auch Calciumphosphat geeignet.

Entsprechende Verfahren sind im Stand der Technik bekannt und beispielsweise in "Transfection Technologies" (Methods Mol. Biol. 2000; 130: 91-102) oder Current Protocols (Ausubel et al., 2002; 9.1) beschrieben.

In einer zusätzlichen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Transfektion mittels DNA-bindender magnetischer biokompatibler Mikropartikel durchgeführt.

Der Begriff "biokompatible Mikropartikel" bezeichnet Mikropartikel, die biologisch inert sind oder in der Zelle abgebaut werden können.

In dieser bevorzugten Ausführungsform können bereits in dem Verfahrensschritt der DNA-Preparation modifizierte magnetische Mikropartikel verwendet werden, die anschließend direkt zur Transfektion eingesetzt werden können. Dem nachfolgend als Magnetotransfektion bezeichneten Verfahren liegen folgende Parameter zugrunde:

Die transfektionsfähige DNA wird an biokompatible, magnetische Mikropartikel gebunden. Die Mikropartikel mit der gebundenen DNA werden auf die Zellkulturen aufgebracht. Durch Anlegen eines Magnetfeldes werden die DNA-Mikropartikel-Komplexe auf der Zelloberfläche aufkonzentriert und über endozytotische Prozesse in die Zelle aufgenommen. Alternativ können die DNA-Mikropartikel durch Verstärken des Magnetfeldes in die Zelle/den Zellkern eingebracht werden. Ein derartiges Verfahren der Magnetotransfektion ist im Stand der Technik bekannt und beispielsweise in der PCT/EP01/07261 beschrieben. Die Effektivität dieses Verfahrens kann durch die Verwendung lipophiler Aufnahmeverbesserer z.B. durch Lipofektamin noch weiter gesteigert werden.

Die magnetische Aufkonzentrierung der Komplexe bzw. das Einbringen der DNA-Mikropartikel in die Zelle/den Zellkern auf der Zelloberfläche bewirkt eine erheblich

erhöhte Transfektionseffizienz. Dadurch kann die eingesetzte Proben- (DNA-) Menge reduziert werden und ermöglicht im Hinblick auf die Menge bei einem Hochdurchsatzsystem eingesetzten Proben eine erhebliche Kostenersparnis. Weiterhin kann durch die Verwendung dieser magnetischen Mikropartikel der Transfektionsprozess auf einem Robotersystem durchgeführt werden, welches ähnliche Spezifikationen wie das zur DNA-Präparation verwendete Robotersystem aufweist. Zusätzlich können die Verfahrensschritte weiter reduziert und der Gesamt-Prozeß beschleunigt werden.

Diese bevorzugte Ausführungsform stellt ein Hochdurchsatz-Transfektionssystem bereit, mit dem auf besonders kosten- und zeitsparende Weise ein Tagesdurchsatz von bis zu 40000 Proben pro Tag realisiert werden kann.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der dritte Roboter gekennzeichnet durch mindestens eines und vorzugsweise alle der nachfolgenden Merkmale (a) Bandstraßentransportsystem kombiniert mit Greifarmen für Mikrotiterplatten zum Umladen der Produkte und Transfer der Mikrotiterplatten zwischen den Produktbearbeitungsstationen, (b) im Transportsystem integrierte Produktbearbeitungsstationen, insbesondere Pipettier-Stationen, Schüttler, Inkubationsplätze sowie Brutschrank zur Kultivierung der Transfektanten, (c) Sensorik zur Detektion von Produktpositionen sowie zur Fehlerdetektion, (d) sterile Überdruckbelüftung zur Verhinderung von Kontaminationen der Zellkulturen, (e) Software zur verschachtelten Bearbeitung mehrerer in der Maschine befindlichen Prozesse für einen kontinuierlichen Produktionsbetrieb und (f) Computer-gestütztes Strich-Code („Barcode“-Identifikations- und Nachverfolgungssystem („Tracking“) bevorzugt mit internem Produkt-Tracking, das eine Zeitstempel- („Timestamp“-) Funktion zur Verschachtelung zeitkritischer Subprozesse enthält.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der vierte Roboter gekennzeichnet durch mindestens eines und vorzugsweise alle der nachfolgenden Merkmale (a) System zur Bestimmung von Fluoreszenz, Lumineszenz bzw. Farbreaktionen aus Zellkultur-Assays, (b) Pipettier-Station mit

Greifarm für Mikrotiterplatten zum Transfer der Mikrotiterplatten vom Brutschrank zu und zwischen den Produktbearbeitungsstationen, (c) Bearbeitungsplätze für Zugabe und Absaugen von Zellkultur-Medien bzw. Reagentien und Inkubation im Brutschrank und (d) Computer-gestütztes Strich-Code („Barcode“)-Identifikations-und Nachverfolgungssystem („Tracking“).

Das System ist vorzugsweise ein ELISA-Reader oder ein Mikrotiterplatten-Imaging-System. Ferner bevorzugt ist, daß das System zur Bestimmung der Zellmorphologie geeignet ist. Wie bei den anderen Robotern ist bevorzugt, daß die Mikrotiterplatte 96 oder 384 Vertiefungen aufweisen. Neben den Bearbeitungsplätzen für die Zugabe und das Absaugen von Zellkulturmedien etc. kann der Roboter weitere Produktbearbeitungsstationen aufweisen, wie z.B. Schüttler, Inkubatorplätze.

In einer zusätzlichen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der vierte Roboter gekennzeichnet durch mindestens eines und vorzugsweise alle der nachfolgenden Merkmale (a) digitales Bildverarbeitungssystem und Bildaquisitionssystem zur Bestimmung von Zell- Morphologie, Lumineszenz und/oder Fluoreszenz, (b) Pipettier-Station mit Greifarm für Mikrotiterplatten zum Transfer der Mikrotiterplatten vom Brutschrank zu und zwischen den Produktbearbeitungsstationen, (c) Bearbeitungsplätze für Zugabe und Absaugen von Zellkultur-Medien bzw. Reagentien und Inkubation im Brutschrank und (d) Computer-gestütztes Strich-Code („Barcode“)-Identifikations-und Nachverfolgungssystem („Tracking“).

Unter dem Begriff " Bildverarbeitungssystem" ist ein System zu verstehen, das in der Lage ist, automatisch Lumineszenz- oder Fluoreszenzeigenschaften-Unterschiede und Morphologie-Unterschiede der zu untersuchenden Zellen zu detektieren und zu analysieren. Vornehmlich basiert die Datenverarbeitung eines solchen Systems auf neuronalen Netzen oder anderen dem Stand der Technik entsprechenden digitalen bildanalytischen Algorithmen.

Unter dem Begriff " Bildaquisitionssystem" ist eine automatisierte Mikroskopierstation zu verstehen, die durch Kamera- oder "Scanning"-Systeme in der Lage ist, Bilder der zu untersuchenden Zellen zu generieren.

Sowohl Bildverarbeitungs- als auch Aquisitionssystem sind hierbei für einen Hochdurchsatz geeignet.

In noch einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das automatische Screenen ein funktionelles Screenen.

Der Begriff "funktionelles Screenen" bedeutet im Sinne dieser Erfindung, daß die Nukleinsäure, wie DNA oder das davon kodierte (Poly)peptid auf eine Funktion getestet wird. Eine RNA kann auf eine Ribozym-, eine anti-sense Eigenschaft oder auf die Bindungseigenschaft im Sinne eines Aptamers hin getestet werde. Überwiegend wird jedoch das kodierte (Poly)peptid auf eine gewünschte Eigenschaft getestet.

Ein RNAi-Oligonucleotid (doppelsträngige RNA) (Elbashir et al., 2002) kann auf seine Eigenschaft hin getestet werden, die Expression von Genen zu vermindern oder auszuschalten.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das funktionelle Screenen ein Screenen auf eine enzymatische, pharmakologische oder therapeutische Eigenschaft.

Diese Eigenschaft wird üblicherweise an dem (Poly)peptid getestet. Beispielsweise kann die Eigenschaft, Apoptose in der Zelle zu induzieren, anhand von Zellmorphologie oder Zell-Assays wie CDD⁺-Assay (Roche Diagnostics, Basel/Schweiz) oder durch Caspase-Aktivierung bestimmt werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das funktionelle Screening ein Screenen auf die Funktion von sekretierten Proteinen. Hierbei werden die von der transfizierten cDNA codierten Proteine in den Zellüberstand sezerniert. Dieser Überstand wird auf Zielzellen überführt und die Funktion des sekretierten Proteins durch Wirkung auf die Zielzelle bestimmt. Alternativ kann auch die mit der cDNA transfizierte Zelle mit der Zielzelle in Kontakt gebracht werden und die Funktion des exprimierten Proteins (beispielsweise auf der Zelloberfläche) durch Wirkung auf die Zielzelle bestimmt werden.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das funktionelle Screenen ein Screenen auf Aktivierung oder Suppression eines Reportersystems.

Geeignete Reportersysteme sind im Stand der Technik bekannt und umfassen Reporterassays (beispielsweise zur transkriptionellen Aktivierung von Indikatorproteinen, enzymatische Aktivierung /Deaktivierung von Indikatorproteinen). Beispiele sind das "Green Fluorescent Protein" (GFP), Luciferase (Firefly) aus dem Bereich der auf Fluoreszenz basierenden Reportersysteme.

In weiteren Ausführungsformen ist das Screenen ein Screenen nach veränderter Zell-Morphologie, Zelltod oder Proliferation.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sind 2, 3 oder alle 4 Roboter in einer Bandstraße angeordnet.

In dieser bevorzugten Ausführungsform werden mindestens 2, wie 3 oder alle 4 einzelnen Arbeitsstationen / Roboter für Koloniepicken, DNA-Präparation, DNA-Transfektion und Auslesen des funktionellen Screening-Assays zusätzlich durch Bandstraßensysteme verknüpft bzw. kombiniert. Bisher notwendige Zwischenschritte zwischen den einzelnen Prozessen werden dadurch vermieden und der Probendurchsatz weiter erhöht.

Durch den Einsatz von Bandtransportsystemen in Kombination mit Überkopfmanipulatoren wird durch entsprechende Verschachtelung der

Prozeßschritte ein serieller Produktionsprozeß erreicht, der im Gegensatz zu klassischen Pipetierstationen keine Limitation bezüglich des Produktionsvolumens aufweist. Die alternative Verwendung von 96-Loch- oder 384-Loch-Platten erhöht zusätzlich die Flexibilität.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein(e) im Screeningverfahren identifizierte(s) DNA, (Poly)peptid oder diese(s) enthaltende Transfektante aufgereinigt oder isoliert.

Für die weitere Bearbeitung der im Screening-Verfahren positiv getesteten DNA/RNAi-Oligonucleotide/(Poly)peptide ist es wünschenswert, daß die Substanzen oder die entsprechende Transfektante zu einer nicht mehr kontaminierten und damit reinen Form aufgereinigt wird. Dies ist mit dem erfindungsgemäßen Verfahren auf besonders einfache Weise möglich, da z.B. die positiv getestete Substanz unmittelbar über den Rückgriff auf die Masterplatte zur Verfügung steht. Die weiteren Aufreinigungsschritte für die Substanzen oder die entsprechenden Transfektanten können nach konventionellen Verfahren erfolgen.

Allgemein kann der Gesamtprozess, welcher der Erfindung zugrunde liegt, beispielsweise wie folgt dargestellt werden:

1. Picken der Bakterienkolonien und Replikation (Roboter 1)

cDNA Bänke werden auf Agar Platten ausplattiert, die einzelnen Kolonien gepickt und in Mikrotiterplatten transferiert, in denen die Bakterien zur Vermehrung kultiviert werden. In einem 2. Schritt werden aus diesen Master-Platten mehrere Wachstumsplatten angeimpft und zur Vermehrung kultiviert, um ausreichend Bakterien für die DNA Isolierung zu generieren (Replikation).

2. DNA-Präparation (Roboter 2)

Die Wachstumsplatten mit der Bakteriensuspension werden zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Anschließend werden die Pellets in einem RNase-haltigem

Puffer resuspendiert (P1), ein alkalischer Lysepuffer (P2) zugesetzt und dieser anschließend neutralisiert (P3). Diese Schritte werden auf einem Orbitalschüttler durchgeführt, an dem ein Mehrkanaldispenser befestigt ist.

Nach einer kurzen Inkubation werden die Platten zentrifugiert und der Überstand in eine Zwischenplatte verbracht. Anschließend wird P4 zur Bindung bakterieller Endotoxine zudispensiert, nach einer Inkubation erneut zentrifugiert und der Überstand in eine 2. Zwischenplatte verbracht. Zu diesem Überstand wird Silika dispensiert, um die DNA zu binden. Es wird zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mit Aceton gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wird der Acetonüberstand abgesaugt, das Silika Pellet mit 60°C heißem Wasser resuspendiert (Ablösung der DNA), zentrifugiert und die DNA Lösung in Endplatten verbracht.

(Puffer 1: Tris EDTA mit RNase, P2: NaOH / SDS, P3: Kaliumacetatpuffer, P4: SDS in Isopropanol)

3. DNA-Transfektion (Roboter 3)

Eine definierte Menge der DNA Lösung aus dem in Roboter 2 produzierten DNA Platten wird in Zwischenplatten pipettiert und ein Kontrollplasmid (β -Gal), Calciumchlorid, HBS zugegeben. Nach einer Inkubation zur Komplexbildung wird Chloroquine zum Ansatz dispensiert, und nach der Mischung eine definierte Menge des Ansatzes auf die Zellkultur pipettiert. Nach 4-5 h wird ein Mediumwechsel durchgeführt.

4. funktioneller Screening Assay (Roboter 4)

Nach 24-48h wird zu den Zellkulturplatten ein Substrat zugegeben, welches bei apoptotischen Zellen einen Farbumschlag verursacht. Dieser Farbwechsel wird in einem ELISA Reader ausgewertet und die Zellen verworfen.

2) DNA-Präparations- und Transfektions-Verfahren unter Verwendung von magnetischen Mikropartikeln:

Bakterien werden nach ihrem Wachstum in Wachstumsplatten zentrifugiert und mit einem RNase Puffer behandelt. Die Resuspendierung der Bakterien erfolgt auf einem Orbitalschüttler. Anschließend werden ein lysierender und ein neutralisierender Puffer zugefügt. Durch die Zugabe von einer ersten Sorte magnetischen Mikropartikel werden Zelldebris und Proteine gebunden. Die magnetischen Mikropartikel werden auf einer Magnetplatte abgetrennt und der Überstand in eine Zwischenplatte gegeben. Danach wird optional eine zweite Sorte magnetischer Mikropartikel zugegeben, welche an bakterielle Endotoxine binden. Diese werden ebenfalls magnetisch abgetrennt und der Überstand in eine 2. Zwischenplatte verbracht. Diese Schritte können durch Zugabe einer Mischung beider Mikropartikelsorten kombiniert werden.

Alternativ können Endotoxin-Fällungsreagenzien eingesetzt werden, welche nach der Fällung der Endotoxine über den ersten Mikropartikel-Separationsschritt entfernt werden.

In einem letzten Schritt werden Magnetische Mikropartikel zugegeben, welche die DNA binden. Von diesen magnetische Mikropartikeln kann die DNA entweder eluiert und für Transfektionen eingesetzt werden oder bei entsprechender Formulierung der Mikropartikel direkt für Transfektionen eingesetzt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform können die während der DNA Isolierung hergestellten DNA-Mikropartikel-Komplexe direkt für Transfektionen eingesetzt werden.

Das Beispiel erläutert die Erfindung.

Beispiel 1: Ablauf des Screeningverfahrens zur Bestimmung der Funktion von Genen bzw. Genprodukten

1. Kolonie Picken und Replikation

Die DNA enthaltenden Bakterien wurden auf Agarplatten mit Selektionsantibiotikum so ausplattiert, daß eine möglichst hohe Zahl einzelner Klone gleichmäßig auf den Platten verteilt vorlag. Nach einer Übernacht-Inkubation bei 37°C wurden die

Kolonien von einem Roboter gepickt und in 384er Mikrotiterplatten (MTP) verbracht, in denen 60 µl LB Medium mit Selektionsantibiotikum vorlag. Diese Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und am folgenden Tag mit einer Mischung aus LB Medium und Glycerin überschichtet, so daß die Endkonzentration von Glycerin 15% betrug. Anschließend wurden die Platten (nachfolgend als Master MTP bezeichnet) bei -80°C gelagert.

Zur weiteren Verwendung wurden die Master MTP aufgetaut und mit einem Replikationstool auf einem ersten Roboter in 4 X 96er „Deepwell“-MTP repliziert. In diesen 96er MTP wurden je 1,5 ml LB Medium mit Selektionsantibiotikum vorgelegt. Nach dem Animpfen wurden die Platten über Nacht in einem Schüttelschrank bei 37°C inkubiert, die Schüttelgeschwindigkeit betrug 280 rpm.

2. DNA Präparation

Die 96er MTP wurden bei 3000g für 5min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Auf einer Schüttelstation mit Dispenser wurden 170 µl P1 (50 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0; 100 µg/ml RNase A (Qiagen) zugegeben, 5min bei 1000 rpm geschüttelt, 170 µl P2 (200 mM NaOH; 1 % SDS) zugegeben, für 10s bei 300 rpm geschüttelt und für 5min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 170 µl P3 (3 M KAc, pH 5,5) zugegeben und für 30 s bei 1000 rpm geschüttelt. Nach einer 5min Inkubation bei 4°C wurden die MTP für 5 min bei 3500 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in eine Zwischen-MTP verbracht. Zu dem Überstand wurden 120 µl P4 (2,5 % SDS (Roth) in Isopropanol) gegeben und für 20 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde für 10 min bei 3500 g abzentrifugiert und der Überstand in eine neue Zwischenplatte verbracht. Es wurden 120 µl Silika (50 mg/ml SiO₂ (12,5 g auf 250 ml Wasser) zugegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Die Silikasuspension wurde hierbei folgendermaßen hergestellt: 12,5 g Silika auf 250 ml Wasser wurde 30 min gerührt, der Überstand (enthält Silikastaub) sedimentiert; abgenommen; 150 µl konz. HCl zugegeben, mit H₂O aufgefüllt auf 250 ml (Messzylinder) und autoklaviert. Anschließend wurde für 5 min bei 2000 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Es wurden 400 µl Aceton zugegeben, für 1 min bei 1000 rpm geschüttelt und anschließend 5 min bei 2000 g abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Platten mit den

Silikapelletts für 20 min auf einer Heizplatte bei 70°C getrocknet. Anschließend wurden 140 µl bidestilliertes Wasser mit einer Temperatur von 65°C zugegeben, 5min bei 800 rpm geschüttelt, 5min bei 3000 g abzentrifugiert und der Überstand mit der DNA in einer 96 Well Polystyrol MTP gelagert.

3. Transfektion

Die zu transfizierenden Zellen wurden am Vortag der Transfektion mit einer Zelldichte von ca. 8000 Zellen / Well in einer 96 Well Zellkulturplatte ausplattiert.

In eine Zwischen MTP wurde 5µl β-Gal Plasmid (c= 100ng/µl) dispensiert und anschließend 20 µl der DNA Lösung (c=100ng/µl) zugegeben. Anschließend wurden 20 µl L1 (0,25 M CaCl₂) zugegeben, kurz geschüttelt und anschließend 25 µl L2 (2x HBS) zugegeben. Nach 20min Inkubation bei RT wurden 15 µl L3 (2 mM Chlorochin-Lösung) zugegeben und kurz geschüttelt. Von dieser Mischung wurden 9 µl auf die Zellen gegeben und für 5-6 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde ein Mediumwechsel (DMEM / 10 % FCS) durchgeführt. Nach Inkubation über Nacht wurde erneut ein Mediumwechsel (DMEM / 10 % FCS) durchgeführt.

4. Funktionelles Auslesen

Zu den transfizierten Zellen wurden 30 µl CPRG Lösung, 2,31 ml 0,1 M Natriumphosphatlösung, 30 µl 100x MgCl₂, 660 µl CPRG-Lösung zu jedem Well der Zellkulturplatte gegeben und für 1-3 h inkubiert. Anschließend wurden die Platten in einem ELISA Reader vermessen (Absorptionsmessung bei 570 nm)

Beispiel 2: funktionelles Screening nach sekretierten Proteinen:

COS-7 Zellen werden mit einer Zelldichte von etwa 5000 Zellen / Well in 10% DMEM ausgesät und 24h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die cDNA wird durch Lipofektion mit Metafectene (Biontex, München) in die Zellen eingebracht und 3h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach vollständiger Abnahme des Mediums wird Endothelial Cell Growth Medium (PromoCell, Heidelberg) zugegeben und die Zellen 48h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wird der Überstand abgenommen und auf Endothelzellen (Human Umbelical Vein Endothelial Cells, HUVECs oder Microvascular Endothelial Cells, HMVECs) überführt.

Diese HUVEC Zellen werden zuvor mit einer Zelldichte von 2000 Zellen / Well in Endothelial Cell Growth Medium (Promocell, Heidelberg) ausgesät. Nach vollständiger Entnahme des Mediums wird der Überstand der COS-7 Zellen auf die Endothelzellen überführt. Die Zellen werden 6 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert und die Aktivitäten der sekretierten Proteine durch die zytosolische Reduktion von Alamar Blue bestimmt (BioSource, Solingen) bestimmt.

Die einzelnen Versuchsschritte werden, sofern nicht anders angegeben, mit Protokollen nach Current Protocols (Ausubel et. al, 2002) durchgeführt.

Ansprüche

1. Verfahren zum Screenen einer Sammlung von Nukleinsäuremolekülen auf eine gewünschte Eigenschaft der Nukleinsäure oder eines davon kodierten (Poly)peptids, umfassend die Schritte
 - (a) automatisiertes Picken einer Sammlung von Zellen, die die Sammlung von Nukleinsäuremolekülen enthalten, mittels eines ersten Roboters;
 - (b) automatisierte Lyse der Zellen mittels eines zweiten Roboters;
 - (c) automatisierte Abtrennung der Zell-DNA vom Zelldebris mittels des zweiten Roboters;
 - (d) gegebenenfalls automatisierte Abtrennung von Endotoxinen von der DNA mittels des zweiten Roboters sofern die Zellen Bakterien sind;
 - (e) automatisierte Transfektion von Zellen mit der in Schritt (c) oder, sofern die Zellen Bakterien sind, in Schritt (d) erhaltenen DNA mittels eines dritten Roboters; und
 - (f) automatisiertes Screenen auf die gewünschte Eigenschaft mittels eines vierten Roboters.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Sammlung von Nukleinsäuremolekülen eine Genbank oder eine Klonssammlung ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Nukleinsäuremoleküle genomische DNA- oder cDNA-Moleküle oder RNAi-Oligonucleotide sind.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, wobei die Genbank eine Expressions-cDNA-Genbank, vorzugsweise eine eukaryontische Genbank, besonders bevorzugt eine humane Genbank ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Zellen in Schritt (a) und/oder Schritt (e) Säugerzellen, Insektenzellen, Hefezellen oder Bakterien sind.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Bakterien gram-negative Bakterien sind.
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die gram-negativen Bakterien zur Art *E. coli* gehören.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei mindestens einer der Schritte (a) bis (f) in Mikrotiterplatten durchgeführt werden.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei sämtliche Schritte (a) bis (f) in Mikrotiterplatten durchgeführt werden.
10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, wobei die Mikrotiterplatten mit Barcodes versehen sind.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei der erste Roboter gekennzeichnet ist durch
 - (a) digitales Bildverarbeitungssystem zur Erfassung der ausplattierten Bakterien,
 - (b) Arbeits-Station mit Greifarm für Mikrotiterplatten zum Transfer der Mikrotiterplatten zwischen den Bearbeitungsstationen,
 - (c) Separations-Modul, versehen mit einem oder mehreren Nadelbestückten Köpfen zum Picken von ausplattierten Einzelkolonien und Ablage in Mikrotiterplatten,
 - (d) integrierte Produktbearbeitungsstationen zur Säuberung der Nadeln zwischen den Arbeitsschritten und Replikation der abgelegten Einzelkolonien in Mikrotiterplatten und
 - (e) Computer-gestütztes Strich-Code („Barcode“)-Identifikations-und Nachverfolgungssystem („Tracking“).
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Lyse eine alkalische Lyse ist.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei der zweite Roboter gekennzeichnet ist durch
 - (a) Bandstraßentransportsystem kombiniert mit Greifarmen für Mikrotiterplatten zum Umladen der Produkte und Transfer der Mikrotiterplatten zwischen den Produktbearbeitungsstationen,
 - (b) im Transportsystem integrierte Produktbearbeitungsstationen, insbesondere Zentrifugen, Pipettier-Automaten, Schüttler und Inkubationsplätze zur Inkubation bei verschiedenen Temperaturen,
 - (c) Sensorik zur Detektion von Produktpositionen sowie zur Fehlerdetektion,
 - (d) Software zur verschachtelten Bearbeitung mehrerer in der Maschine befindlichen Prozesse für einen kontinuierlicher Produktionsbetrieb und
 - (e) Computer-gestütztes Strich-Code („Barcode“)-Identifikations-und Nachverfolgungssystem („Tracking“) bevorzugt mit internem Produkt-Tracking, das eine Zeitstempel- („Timestamp“-) Funktion zur Verschachtelung zeitkritischer Subprozesse enthält.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei die Abtrennung der Zell-DNA in Schritt (c) mittels Silica-Partikel erfolgt.
15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die Silica-Partikel magnetische Silica-Partikel sind.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei die Abtrennung der Endotoxine in Schritt (d) mittels Endotoxin-bindender Partikel erfolgt, die vorzugsweise magnetische Endotoxin-bindende Partikel sind.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei die Abtrennung der Endotoxine in Schritt (d) durch Fällung mit SDS/Isopropanol erfolgt.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16, wobei die an Silica-Partikel gebundene DNA durch Waschen mit Aceton weiter aufgereinigt wird.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, wobei die Transfektion von Zellen in Schritt (e) durch Calciumphosphat, Elektroporation oder durch Lipofaktoren vermittelt wird.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, wobei die Transfektion mittels DNA-bindender magnetischer biokompatibler Mikropartikel durchgeführt wird.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, wobei der dritte Roboter gekennzeichnet ist durch
 - (a) Bandstraßentransportsystem kombiniert mit Greifarmen für Mikrotiterplatten zum Umladen der Produkte und Transfer der Mikrotiterplatten zwischen den Produktbearbeitungsstationen,
 - (b) im Transportsystem integrierte Produktbearbeitungsstationen, insbesondere Pipettier-Stationen, Schüttler, Inkubationsplätze sowie Brutschrank zur Kultivierung der Transfektanten,
 - (c) Sensorik zur Detektion von Produktpositionen sowie zur Fehlerdetektion,
 - (d) sterile Überdruckbelüftung zur Verhinderung von Kontaminationen der Zellkulturen,
 - (e) Software zur verschachtelten Bearbeitung mehrerer in der Maschine befindlichen Prozesse für einen kontinuierlicher Produktionsbetrieb und
 - (f) Computer-gestütztes Strich-Code („Barcode“)-Identifikations-und Nachverfolgungssystem („Tracking“) bevorzugt mit internem Produkt-Tracking, das eine Zeitstempel- („Timestamp“-) Funktion zur Verschachtelung zeitkritischer Subprozesse enthält.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21, wobei der vierte Roboter gekennzeichnet ist durch
 - (a) System zur Bestimmung von Fluoreszenz, Lumineszenz bzw. Farbreaktionen aus Zellkultur-Assays,

- (b) Pipettier-Station mit Greifarm für Mikrotiterplatten zum Transfer der Mikrotiterplatten vom Brutschrank zu und zwischen den Produktbearbeitungsstationen,
 - (c) Bearbeitungsplätze für Zugabe und Absaugen von Zellkultur-Medien bzw. Reagentien und Inkubation im Brutschrank und
 - (d) Computer-gestütztes Strich-Code („Barcode“)-Identifikations-und Nachverfolgungssystem („Tracking“).
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21, wobei der vierte Roboter gekennzeichnet ist durch
- (a) digitales Bildverarbeitungssystem und Bildaquisitionssystem zur Bestimmung von Zell- Morphologie, Fluoreszenz und/oder Lumineszenz
 - (b) Pipettier-Station mit Greifarm für Mikrotiterplatten zum Transfer der Mikrotiterplatten vom Brutschrank zu und zwischen den Produktbearbeitungsstationen,
 - (c) Bearbeitungsplätze für Zugabe und Absaugen von Zellkultur-Medien bzw. Reagentien und Inkubation im Brutschrank und
 - (d) Computer-gestütztes Strich-Code („Barcode“)-Identifikations-und Nachverfolgungssystem („Tracking“).
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23, wobei das automatische Screenen ein funktionelles Screenen ist.
25. Verfahren nach Anspruch 24, wobei das funktionelle Screenen ein Screenen auf eine enzymatische, pharmakologische oder therapeutische Eigenschaft ist.
26. Verfahren nach Anspruch 14 oder 25, wobei das funktionelle Screenen ein Screenen auf Aktivierung oder Suppression eines Reportersystems ist, oder wobei das Screenen ein Screenen auf die Funktion eines sekretierten Proteins ist.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 26, wobei 2, 3 oder 4 Roboter in einer Bandstraße angeordnet sind.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 27, wobei ein(e) im Screeningverfahren identifizierte(s) DNA, (Poly)peptid oder diese(s) enthaltende Transfektante aufgereinigt oder isoliert wird.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Screenen einer Sammlung von Nukleinsäuremolekülen auf eine gewünschte Eigenschaft der Nukleinsäure oder eines davon kodierten (Poly)peptids, umfassend die Schritte (a) automatisiertes Picken einer Sammlung von Zellen, die die Sammlung von Nukleinsäuremolekülen enthalten, mittels eines ersten Roboters; (b) automatisierte Lyse der Zellen mittels eines zweiten Roboters; (c) automatisierte Abtrennung der Zell-DNA vom Zelldebris mittels des zweiten Roboters; (d) optional automatisierte Abtrennung von Endotoxinen von der DNA mittels des zweiten Roboters sofern die Zellen Bakterien sind; (e) automatisierte Transfektion von Zellen mit der in Schritt (c) oder, sofern die Zellen Bakterien sind, in Schritt (d) erhaltenen DNA mittels eines dritten Roboters; und (f) automatisiertes Screenen auf die gewünschte Eigenschaft mittels eines vierten Roboters. Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Verbesserung der Bindungseigenschaften des (Poly)peptids, das durch die in dem erfindungsgemäßen Screeningverfahren identifiziert oder von der identifizierten oder isolierten DNA kodiert wird, sowie ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels auf der Basis von mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen (Poly)peptiden und ferner die Formulierung des erhaltenen Stoffes mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel.